

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016 roku

Poszukiwanie źródeł odporności owsa (*Avena sativa* L.) na nowy patogeniczny i mykotoksynotwórczy gatunek – *Fusarium langsethiae*

Decyzja MRiRW:

HOR hn – 801 – PB – 1/16 z dnia 9 maja 2016 r., zadanie nr 29

Okres realizacji zadania:

01.01.2016–31.12.2016

Podmiot realizujący zadanie:

**Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
w Bydgoszczy**

Kierownik zadania:

dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. nadzw. UTP

Zakład Fitopatologii Molekularnej Katedry Entomologii i Fitopatologii Molekularnej

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, UTP w Bydgoszczy

Ul. Ks. A. Kordeckiego 20

85-225 Bydgoszcz

tel.: 52 3749491 / 52 3749342

e-mail: Grzegorz.Lemanczyk@utp.edu.pl

Wykonawcy zadania:

prof. dr hab. inż. Czesław Sadowski

dr inż. Aleksander Łukanowski

dr inż. Anna Baturo-Cieśniewska

1. Tytuł zadania

Poszukiwanie źródeł odporności owsa (*Avena sativa* L.) na nowy patogeniczny i mykotoksynotwórczy gatunek – *Fusarium langsethiae*

2. Cele zadania

Celem zadania jest uzyskanie informacji o wrażliwości linii hodowlanych i genotypów owsa na izolaty *Fusarium langsethiae* o zróżnicowanej wirulencji oraz monitoring polegający na molekularnej analizie ilościowej zanieczyszczenia prób ziarna owsa, pochodzący z pól produkcyjnych, przez *F. langsethiae* i określeniu poziomu skażenia tego ziarna wybranymi mykotoksynami, wytworzonymi w ziarnie w następstwie porażenia tym gatunkiem w warunkach produkcyjnych

3. Opis tematów badawczych

3. 1. Temat badawczy 1

Określenie znaczenia *Fusarium langsethiae* w Polsce na podstawie przeprowadzonego monitoringu zasiedlenia zebranego ziarna owsa, przy zastosowaniu techniki Real-Time PCR oraz zanieczyszczenia ziarna mykotoksynami.

Cel tematu badawczego 1

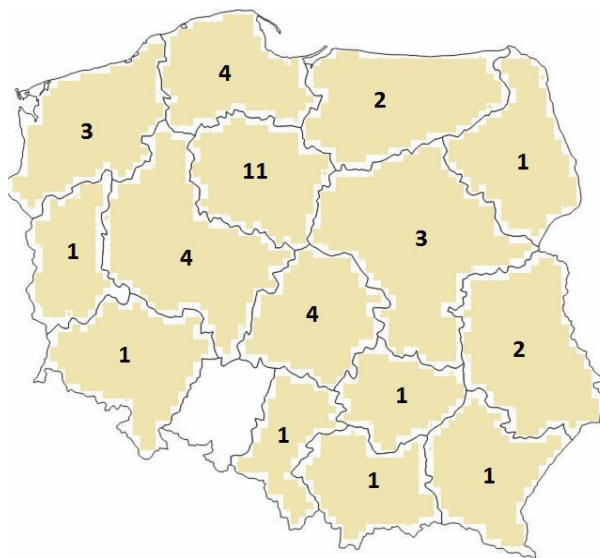
Celem realizowanego tematu badawczego jest uzyskanie informacji dotyczących znaczenia grzyba *Fusarium langsethiae* dla owsa uprawianego w Polsce, określonego na podstawie zanieczyszczenia prób ziarna pochodzących z pól produkcyjnych badanym grzybem oraz na podstawie poziomu skażenia tego ziarna toksynami T-2 i HT-2, wytworzonymi w ziarnie w następstwie porażenia tym gatunkiem w warunkach naturalnych.

Cel założony na rok 2016 został osiągnięty. Przy zastosowaniu techniki Real-Time PCR określono znaczenie *F. langsethiae* dla owsa uprawianego w Polsce w 2016 r., ponadto określono zanieczyszczenie toksynami T-2 i HT-2 prób ziarna pochodzących z pól produkcyjnych.

Materiały i metody

Przeprowadzono monitoring dotyczący zasiedlenia zebranego ziarna owsa przez *F. langsethiae*. Badania te wykonano wykorzystując technikę Real-Time PCR, która umożliwia określenie ilości materiału genetycznego badanego grzyba w ziarnie nawet przy bardzo małych jego ilościach, co ma szczególne znaczenie w przypadku bezobjawowego rozwoju patogena. Monitoring zasiedlenia ziarna owsa przez *F. langsethiae* przeprowadzono dla 40 prób owsa zebranych w 2016 roku, pochodzących z 40 pól produkcyjnych, położonych w czternastu województwach (oprócz województwa opolskiego). Najwięcej prób (11 prób) pochodziło z województwa kujawsko pomorskiego, a w przypadku pozostałych 13 województw było to od 1 do 4 prób (rys. 1).

Przed przystąpieniem do analizy ilościowej badanych prób konieczne było przygotowanie krzywej standardowej dla *F. langsethiae*. Wykonano ją wykorzystując czystą kulturę izolatu FL 0809. Izolację DNA tego grzyba przeprowadzono według zmodyfikowanego protokołu zaproponowanego przez Doyle i Doyle (1990). Krzywą standardową wykonano z wykorzystaniem serii dziesięciokrotnych rozcieńczeń DNA *F. langsethiae*. Do jej wyznaczenia zastosowano specyficzne gatunkowo startery typu SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) dające produkt o wielkości 310 par zasad (Wilson i in. 2004). Reakcję przeprowadzono w LightCycler 480II (Roche, Szwajcaria) z użyciem barwnika LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) zawierającym polimerazę Taq, nukleotydy, bufor i jony Mg^{2+} . Dodatkowo do wszystkich analizowanych próbek została dodana woda w ilości 1,8 μ l oraz po 0,6 μ l starterów o stężeniu 10 $pM \cdot \mu$ l⁻¹.



Rys. 1. Położenie pól produkcyjnych owsa objętych monitoringiem zasiedlenia zebranego ziarna przez *Fusarium langsethiae* przy zastosowaniu techniki Real-Time PCR

Izolację całkowitego DNA z ziarniaków owsa przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem wg Doyle i Doyle (1990). Jedną próbę stanowiło 20 g losowo pobranego ziarna owsa, osuszonego w liofilizatorze (Scanvac, CoolSafe) przez 24 godziny. Następnie próby homogenizowano przez 3 minuty w homogenizatorze Retsch MM 400 (30 drgań/sekundę) w cylindrach stalowych o pojemności 25 ml używając do tego celu dwóch kulek stalowych o średnicy 12 mm. Po rozdrobnieniu ziarniaków owsa do probówki typu Eppendorf o pojemności 2,0 ml pobrano 100 mg i zalano 600 μ l buforu ekstrakcyjnego. Kolejne etapy izolacji były zgodne z wyżej wymienionym protokołem izolacji DNA z wykorzystaniem CTAB, fenolu, chloroformu i alkoholu etylowego. Uzyskane DNA po izolacji doczyszczano przy użyciu zestawu Anty-Inhibitor Kit (A&A Biotechnology). Zawartość całkowitego DNA uzyskanego z ziarna owsa zmierzono wykorzystując fluorometr Quantus (Promega), a do dalszych analiz Real-Time PCR wszystkie próbki rozcieńczono w dejonizowanej wodzie sterylnej do stężenia 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Reakcję przeprowadzono w LightCycler 480II z użyciem LightCycler 480 SYBR Green I Master. Objętość pojedynczej reakcji wynosiła 20 μ l (13 μ l mastermiks + 7 μ l badanej próbki DNA). Wszystkie próby wykonywano w trzech powtórzeniach, a wynik końcowy jest średnią z tych replikacji. W reakcji zastosowano startery SCAR, użyte wcześniej do przygotowania krzywej standardowej, generujące amplikon o długości 310 pz. Kontrola negatywna składała się ze studzienek, w których DNA zostało zastąpione sterylną wodą dejonizowaną. Reakcja amplifikacji była poprzedzona preinkubacją próbek w czasie 10 minut w temperaturze 95°C, natomiast właściwa amplifikacja składała się z 55 cykli. Ostatnim etapem reakcji była analiza krzywej topnienia w zakresie temperatur 65–95°C (rys. 2). Otrzymane wyniki przemnożono przez miano rozcieńczenia danej próbki, aby uzyskać informację o rzeczywistej ilości DNA grzyba w ziarnie owsa. Badania te przeprowadzono w Zakładzie Fitopatologii Molekularnej Katedry Entomologii i Fitopatologii Molekularnej UTP w Bydgoszczy.

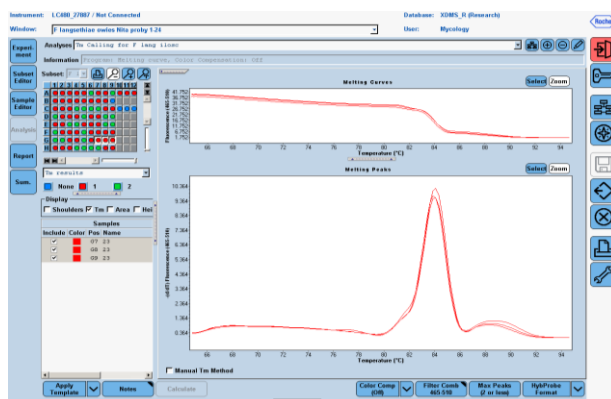
Monitoring techniką Real-Time PCR uzupełniono stosując tradycyjną metodę badawczą polegającą na izolacji grzybów na sztucznej pożywce mikrobiologicznej. Tę technikę zastosowano również w celu pozyskania izolatów *F. langsethiae* do dalszych badań związanych z testowaniem wrażliwości genotypów owsa. Izolacja grzybów na pożywkę PDA przeprowadzona została z 40 prób ziarna owsa pochodzących z pól produkcyjnych. Ziarno odkażano przez 3 minuty w 1% NaOCl, trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej i wykładano po 6 sztuk na szalki Petriego z zestaloną pożywką PDA (pH 5,5), a następnie umieszczano w termostacie w temperaturze 22°C. Na jedną próbę składało się 100 ziarniaków owsa. Po 7-10 dniach inkubacji wyrastające kolonie przeszczepiano na skosy agarowe i przeznaczono do dalszego oznaczania. Szczególną uwagę zwrócono na izolaty cechujące się „prószystą” grzybnią powietrzną. Na podstawie literatury (Schmidt i in. 2004; Torp

i Nirenberg 2004) wstępnie zakwalifikowano je jako *F. langsethiae*. Następnie potwierdzano ich przynależność gatunkową metodą molekularną, przy użyciu techniki PCR (Wilson i in. 2004).

Ponadto dla wybranych 11 prób ziarna owsa, pochodzących z pól produkcyjnych, wykonano analizę dotyczącą zanieczyszczenia ziarna toksyną T-2 i toksyną HT-2. Ze względu na duże koszty takich analiz wybrano tylko 11 prób, reprezentujące różne rejony Polski. Ze względu na brak w Zakładzie Fitopatologii Molekularnej specjalistycznego wyposażenia niezbędnego do przeprowadzenia analiz ilościowego oznaczania zanieczyszczenia ziarna mykotoksynami, ich wykonanie zlecono Katedrze Fizjologii i Toksykologii Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy. Analizę ilościową zawartości toksyny T-2 i HT-2 wykonano metodą HPLC-MS/MS. Próby oczyszczano na kolumnkach Bond Elut[®] Mycotoxin firmy Agilent.

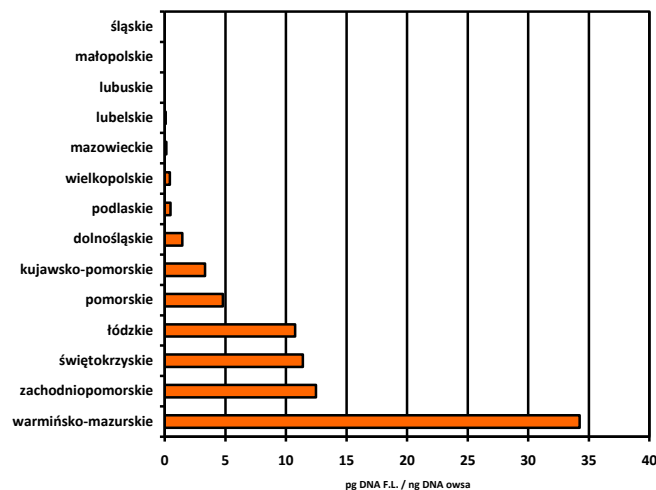
Wyniki

Reakcja Real-Time PCR została przeprowadzona z użyciem niespecyficznego barwnika SYBR Green I, który wiąże wszystkie dwuniciowe fragmenty DNA znajdujące się w badanej próbce, przez co może wykrywać także niespecyficzne produkty reakcji. W celu potwierdzenia uzyskania produktu docelowego została przeprowadzona analiza krzywej topnienia (rys. 2), która jednoznacznie wykazuje, że powstaje oczekiwany produkt reakcji. Uzyskanie w reakcji Real-Time PCR jednego produktu o temperaturze topnienia ok. 84°C świadczyło o obecności *F. langsethiae* w próbce ziarna. W części prób powstawał tylko produkt niespecyficzny, czyli nie stwierdzono obecności DNA *F. langsethiae*.



Rys. 2. Analiza krzywej topnienia - jeden produkt o temperaturze topnienia około 84°C świadczący o obecności *F. langsethiae* w wybranej próbce

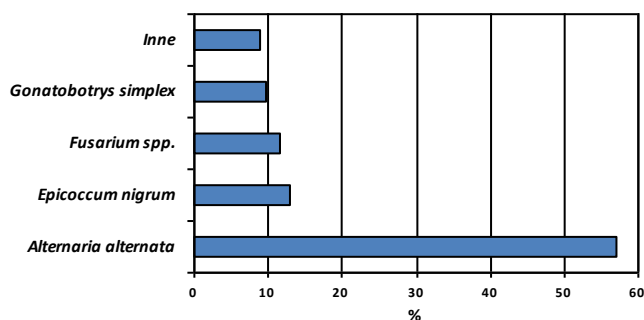
Na podstawie dotychczasowych przeprowadzonych analiz Real-Time PCR (rys. 3) stwierdzono niezbyt duże zasiedlenie przez *F. langsethiae* ziarna owsa zebranego z pól produkcyjnych w 2016 r. Średnio stężenie DNA grzyba w ziarnie owsa wynosiło 6,341 pg DNA *F. langsethiae* na 100 ng DNA ziarna owsa. Jednak nie we wszystkich próbach wykryto *F. langsethiae*. Spośród 40 przeanalizowanych prób obecność *F. langsethiae* stwierdzono w 26 próbach (rys. 4). Najwięcej DNA *F. langsethiae* odnotowano w próbach ziarna owsa pochodzącego z miejscowości Legięć, a następnie Strzelec, Białogardu i Dukli (rys. 5). Rozpatrując występowanie grzyba w zależności od województwa można zauważyć, iż najwięcej DNA *F. langsethiae* stwierdzono w próbach ziarna owsa pochodzącego z województwa warmińsko-mazurskiego. DNA *F. langsethiae* nie stwierdzono w próbach pochodzących z województwa lubuskiego, małopolskiego i śląskiego (rys. 6).



Rys. 6. Stężenie DNA *F. langsethiae* w zebranym ziarnie owsa w zależności od województwa

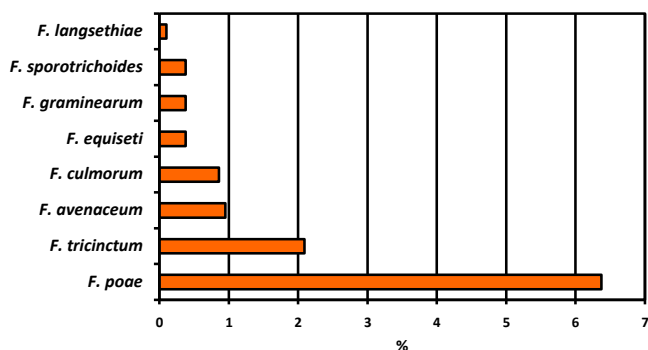


Fot. 1. Kolonie grzybów wyrastające z ziarniaków owsa

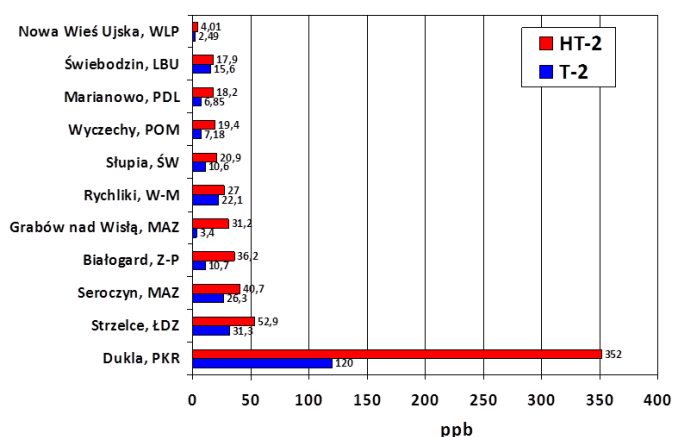


Rys. 7. Dominujące grzyby izolowane z ziarna owsa pochodzącego z pól produkcyjnych

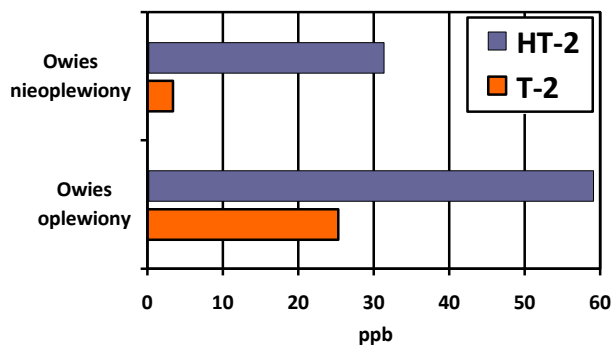
W wyniku przeprowadzonej izolacji grzybów na sztucznej pożywce mikrobiologicznej PDA, z ziarna owsa pochodzącego z pól produkcyjnych owsa, spośród 40 prób ziarna uzyskano tylko 1 izolat *F. langsethiae*. Inne gatunki grzybów nie były głównym przedmiotem badań, jednak ich występowanie mogło znacząco wpływać na liczbę uzyskanych izolatów *F. langsethiae*. Z tego względu zostały one również uwzględnione w analizie. Ziarno owsa najczęściej było zasiedlone przez grzyby saprotroficzne, zwłaszcza *Alternaria alternata*, rzadziej *Epicoccum nigrum* i *Gonatobotrys simplex* (rys 7, fot. 1). Spośród grzybów rodzaju *Fusarium* dominowały *Fusarium poae*, a znacznie rzadziej izolowano *F. tricinctum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. sporotrichoides* i *F. langsethiae* (rys 8).



Rys. 8. Gatunki *Fusarium* izolowane z ziarna owsa pochodzącego z pól produkcyjnych



Rys. 9. Zanieczyszczenia wybranych prób ziarna owsa toksyną T-2 i toksyną HT-2



Rys. 10. Porównanie zanieczyszczenia toksynami T-2 i HT-2 owsa o ziarnie oplewionym z owsem o ziarnie nieoplewionym

We wszystkich 11 przebadanych próbach ziarna owsa pochodzących z pól produkcyjnych stwierdzono obecność toksyny T-2 i toksyny HT-2 (rys. 9). W większym stopniu ziarno zanieczyszczone było przez toksynę HT-2 niż toksynę T-2. Najbardziej zanieczyszczone toksyną T-2 i HT-2 ziarno owsa pochodziło z miejscowości. Przez oba badane toksyny silniej zanieczyszczone było ziarno owsa oplewionego niż ziarno owsa nieoplewionego (rys. 10).

Stwierdzono zależność pomiędzy zawartością w ziarnie owsa DNA grzyba *F. langsethiae* a zanieczyszczeniem go toksyną T-2. Próby ziarna owsa zawierające więcej DNA *F. langsethiae* były również silniej zanieczyszczone toksyną T-2 ($r=0,532$). Stwierdzono również korelację pomiędzy zawartością w ziarnie DNA *F. langsethiae* a zanieczyszczeniem go przez toksynę HT-2 ($r=0,574$).

Wnioski

- A. W ziarnie owsa pochodzącego z większości pól produkcyjnych stwierdzono obecność DNA *F. langsethiae*,
- B. Przeprowadzone badania wskazują, iż czułość analizy Real-Time PCR na obecność *F. langsethiae* w ziarnie owsa okazała się wystarczająca również w próbach z bardzo niskim zasiedleniem ziarniaków, podczas gdy standardowa analiza mykologiczna wykazała sporadyczną obecność tego grzyba,
- C. We wszystkich 11 przebadanych próbach ziarna owsa odnotowano obecność toksyny T-2 i toksyny HT-2.

3.2 Temat badawczy 2

Analiza odporności owsa na porażenie przez *F. langsethiae* prowadzona w formie testu liściowego

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu jest poszukiwanie genotypów owsa odpornych lub wykazujących cechy zmniejszonej podatności na porażenie przez izolaty *Fusarium langsethiae* o zróżnicowanej wirulencji. Cel ten został osiągnięty częściowo, gdyż nie udało się wyodrębnić genotypów odpornych. Wyróżniono jednakże genotypy mniej wrażliwe na porażenie. Do przetestowania pozostało jeszcze więcej genotypów owsa i być może wśród nich znalezione zostaną genotypy odporne.

Materiały i metody

Ocena wrażliwości genotypów owsa na porażenie przez *F. langsethiae* przeprowadzona została w formie testu liściowego w laboratorium Zakładu Fitopatologii Molekularnej Katedry Entomologii i Fitopatologii Molekularnej UTP w Bydgoszczy. Badania te obejmowały 40 genotypów owsa, w tym 3 gatunki: owies zwyczajny (*Avena sativa*) – zarówno genotypy owsa o ziarnie oplewionym jak i ziarnie nieoplewionym, owies szorstki (*Avena strigosa*) i owies głuchy (*Avena fatua*). Na przebadane genotypy owsa składało się 6 zarejestrowanych odmian uprawnych owsa, 1 próba owsa szorstkiego, 1 próba owsa głuchego oraz 32 rodów hodowlanych. Materiał badawczy pozyskano od firm zajmujących się hodowlą materiału siewnego owsa, tj. DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o., oraz Porejestrowego Doświadczalnictwa Odmianowego COBORU. Do sztucznej inokulacji liści owsa wykorzystane zostały 3 izolaty *F. langsethiae* pozyskane z ziarna owsa w latach 2014 (FL 11H4) i 2015 (FL 292P5, FL 303P5). W sumie przetestowano 120 prób.

W celu pozyskania izolatów *F. langsethiae* przeprowadzona została izolacja grzybów na pożywce PDA z 40 prób ziarna owsa pochodzącego z pól produkcyjnych oraz 40 prób, na które składały się badane na wrażliwość genotypy owsa.

Ocena wrażliwości genotypów owsa wykonana została zgodnie z metodyką opisaną przez Imathiu i in. (2009). Kultury jednozarodnikowe wybranych izolatów *F. langsethiae* hodowane były na pożywce PDA. Zawiesinę zarodników uzyskano poprzez splukiwanie sterylną wodą powierzchni kultury a zawiesinę zbierano za pomocą pipety automatycznej. Do określenia koncentracji zarodników wykorzystano komorę Thoma, za pomocą której przygotowano zawiesinę o stężeniu 5×10^5 zarodników·ml⁻³.

Liście różnych genotypów owsa wykorzystane w doświadczeniu pochodziły z dwutygodniowych roślin. Fragmenty długości ok. 4 cm pobierano ze szczytowej części pierwszego liścia. Następnie fragmenty liści uszkodzono mechanicznie w środkowej ich części po stronie doosiowej przy pomocy sterylnych 10 µl końcówek mikropipety. Eksplantaty wyłożono na płytkach Petriego na 0,5% agarze z wodą z dodatkiem kinetyny ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) stroną odosiową do podłoża przyklejając je delikatnie, aby cała powierzchnia eksplantatu stykała się z podłożem. Na każdej płytce umieszczone po 4 uszkodzone fragmenty liści i na każdy z nich w miejscu uszkodzenia nałożono 5 µl zawiesiny zarodników z dodatkiem TritonuX. Płytki inkubowano w temp. 20°C przez 6 dni. Wrażliwość genotypów określano poprzez mierzenie długości strefy nekrozy tkanki liści (fot. 2, 3).



Fot. 2. Test liściowy - porównanie objawów porażenia przez *F. langsethiae*

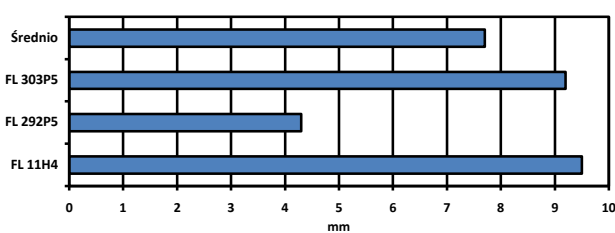


Fot. 3. Porażenie dwóch genotypów owsa przez *F. langsethiae*

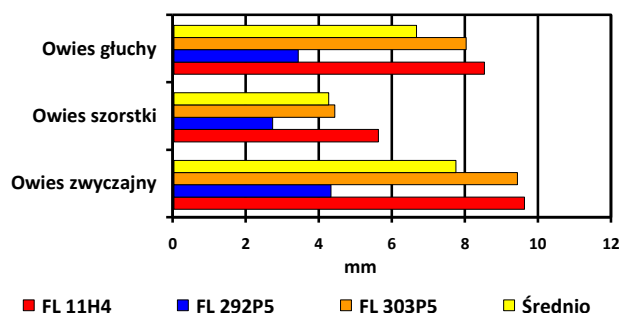
Wyniki

W przeprowadzonym teście liściowym wykazano zróżnicowaną wirulencję izolatów *F. langsethiae*. Silniejszą wirulencją odznaczały się izolaty FL 11H4 i FL 303P5 w porównaniu z FL 292P5. Średnio długość strefy z wyraźnymi zmianami chorobowymi na liściach owsa powodowanymi przez izolat FL 11H4 wynosiła 9,5 mm, dla izolatu FL 303P5 – 9,2 mm, a izolatu FL 292P5 – 4,3 mm (rys. 11).

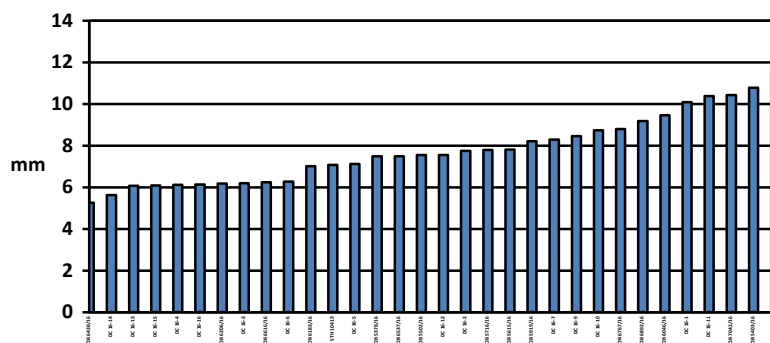
Porażeniu przez *F. langsethiae* uległy genotypy owsa zwyczajnego jak i owsa szorstkiego oraz owsa głuchego. Średnia długość strefy z nekrozą na badanych liściach dla genotypów owsa zwyczajnego wynosiła 7,72 mm, owsa szorstkiego – 4,24 mm a owsa głuchego – 6,64 mm (rys. 12).



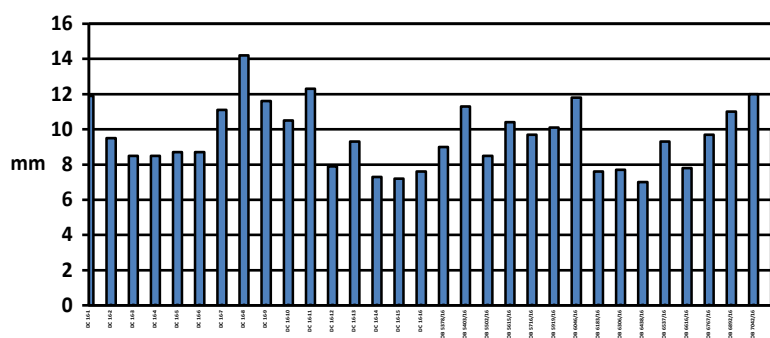
Rys. 11. Zjadliwość izolatów *F. langsethiae* wykorzystanych w badaniach wrażliwości genotypów owsa w zależności od pochodzenia – długość spowodowanej nekrozy na liściu



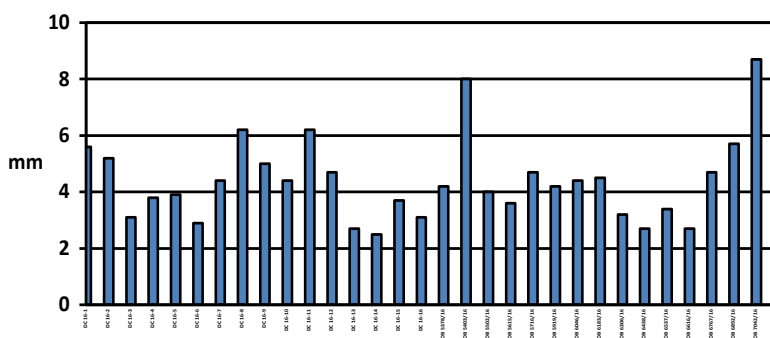
Rys. 12. Wrażliwość gatunków owsa na porażenie przez *F. langsethiae* badana w formie testu liściowego – długość spowodowanej nekrozy na liściu



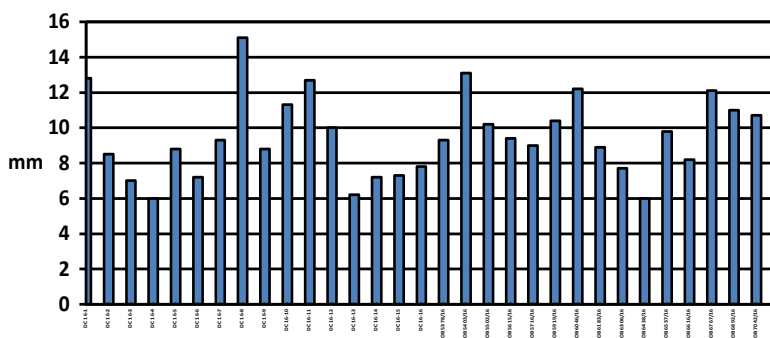
Rys. 13. Wrażliwość rodów hodowlanych owsa na porażenie przez *F. langsethiae* badana w formie testu liściowego – średnia długość nekrozy dla trzech izolatów patogena



Izolat FL 11H4



Izolat FL 292P5

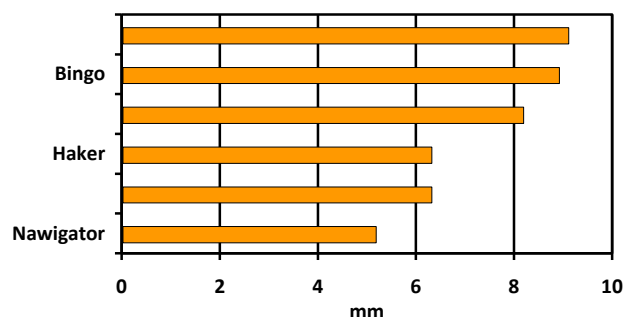


Izolat FL 303P5

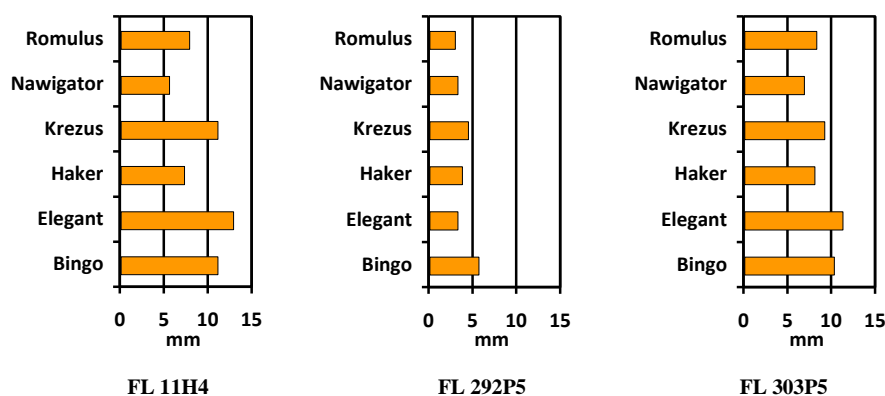
Rys. 14. Wrażliwość rodów hodowlanych owsa, badana w formie testu liściowego, na porażenie przez trzy izolaty *F. langsethiae* uzyskane z pszenicy – długość spowodowanej nekrozy na liściu

Wszystkie przebadane genotypy owsa były porażane przez *F. langsethiae*. Stwierdzono jednak wyraźne zróżnicowanie w ich podatności (rys. 13). Wśród 32 przebadanych rodów hodowlanych odnotowano istotne różnice w ich podatności na *F. langsethiae*, co zaobserwowano zarówno dla wartości średnich, jak również dla wszystkich

trzech izolatów *F. langsethiae*. Średnio dla trzech izolatów *F. langsethiae* najmniej wrażliwym był ród POB 6438/16, a najbardziej wrażliwym ród DC 16-8 (rys. 13). Ogólnie zaobserwowano jednak odmienną wrażliwość rodów na poszczególne izolaty *F. langsethiae*. W przypadku izolatu FL 11H4 istniały podobne tendencje jak dla średniej. Najmniej wrażliwym rodem owsa na porażenie przez izolat FL 292P5 były ród DC 16-14, a najbardziej wrażliwym ród POB 7042/16 (rys. 14). Najmniej wrażliwym rodem hodowlanym owsa na porażenie przez izolat FL 303P5 były DC 16-4, a najbardziej wrażliwym DC 16-8 (rys. 14).



Rys. 15. Wrażliwość odmian owsa na porażenie przez *F. langsethiae* badana w formie testu liściowego – średnia długość nekrozy dla trzech izolatów patogena



Rys. 16. Wrażliwość odmian owsa badana w formie testu liściowego na porażenie przez trzy izolaty *F. langsethiae* – długość spowodowanej nekrozy na liściu

Średnio dla trzech badanych izolatów *F. langsethiae* stwierdzono wyraźne zróżnicowanie pomiędzy wrażliwością 6 przebadanych odmian owsa. Najmniej wrażliwą odmianą na porażenie była odmiana Nawigator, a najbardziej wrażliwymi były odmiany Elegant i Bingo (rys. 15). Badane odmiany cechowały się odmienną wrażliwością na poszczególne izolaty *F. langsethiae* zastosowane do inokulacji (rys. 16).

Wnioski

- Izolaty *F. langsethiae* uzyskane z owsa cechowały się zróżnicowaną wirulencją wobec badanych liści owsa.
- Stwierdzono istotne zróżnicowanie w podatności analizowanych rodów hodowlanych owsa na porażenie przez *F. langsethiae*. Najmniej wrażliwym był ród POB 6438/16, a najbardziej wrażliwym DC 16-8.
- Spośród przebadanych odmian owsa najmniej wrażliwą na *F. langsethiae* okazała się odmiana Nawigator,
- Do tej pory nie stwierdzono istnienia genotypów owsa odpornych na porażenie przez *F. langsethiae*,
- Wszystkie trzy przebadane gatunki owsa były porażane przez *F. langsethiae*. Znacznie większe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie owsa zwyczajnego o ziarnie oplewionym

3. 3. Temat badawczy 3

Analiza odporności owsa na *F. langsethiae* na podstawie jego analizy ilościowej w ziarnie techniką Real-Time PCR.

Cel tematu badawczego 3

Celem tematu jest poszukiwanie genotypów owsa odpornych lub wykazujących cechy zmniejszonej podatności na porażenie przez *F. langsethiae* na podstawie jego analizy ilościowej w ziarnie techniką Real-Time PCR. Cel ten został osiągnięty, jednak badania wymagają kontynuacji gdyż do przetestowania pozostało więcej genotypów owsa.

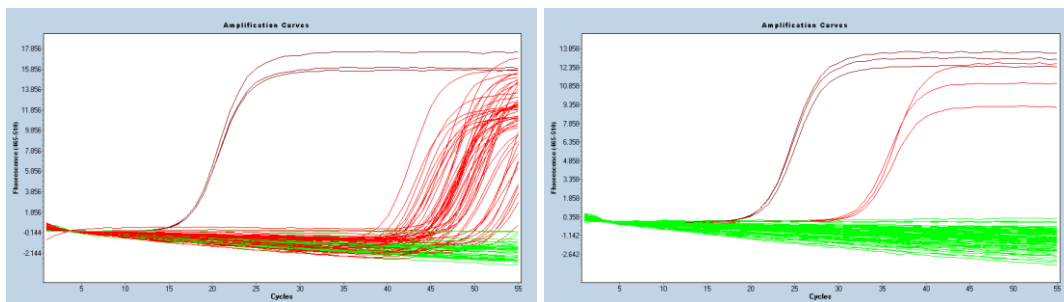
Materiały i metody

W ramach poszukiwania źródeł odporności przeprowadzono również analizę ilościową i jakościową zasiedlenia ziarna rodów hodowlanych, odmian uprawnych owsa, różnych gatunków owsa przez *F. langsethiae*. Materiał badawczy pozyskano od firm zajmujących się hodowlą odmian, tj. DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz z doświadczeń prowadzonych przez COBORU w ramach Porejestrowego Doświadczalnictwa Odmianowego z trzech Zakładów Doświadczalnych, tj. ZDOO Jelenia Góra, ZDOO Rychliki, ZDOO Żabnica. Badania przeprowadzono przy użyciu techniki Real-Time PCR, umożliwiającej określenie ilości materiału genetycznego grzyba w ziarnie. Określanie ilości DNA *F. langsethiae* w ziarnie 40 prób w 3 powtórzeniach (24 rodów hodowlanych, 15 odmian uprawnych owsa zwyczajnego, 1 próba owsa głuchego) wykonano podobnie jak w temacie badawczym nr 1. Badania te przeprowadzono w Zakładzie Fitopatologii Molekularnej UTP w Bydgoszczy.

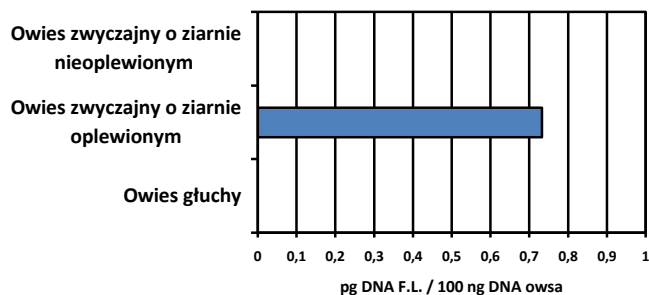
W celu pozyskania izolatów *F. langsethiae* do dalszych badań, związanych z testowaniem wrażliwości genotypów owsa, przeprowadzono izolację grzybów na pożywce mikrobiologicznej. Izolacja grzybów na pożywce PDA przeprowadzona została z 40 prób ziarna wykorzystywanych do testowania wrażliwości genotypów owsa. Izolację wykonano w taki sam sposób jak w przypadku pierwszego tematu badawczego dotyczącego monitoringu występowania *F. langsethiae* w Polsce.

Wyniki

Na podstawie przeprowadzonej analizy ilościowej *F. langsethiae* w ziarnie owsa techniką Real-Time PCR (rys. 17) stwierdzono istotne zróżnicowanie dotyczące wrażliwości pomiędzy przebadanymi gatunkami owsa. Spośród wszystkich przebadanych genotypów owsa największe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono tylko w ziarnie owsa zwyczajnego o ziarnie oplewionym. Obecności DNA *F. langsethiae* nie stwierdzono w ziarnie owsa zwyczajnego o ziarnie nieoplewionym i ziarnie owsa głuchego (rys. 18).

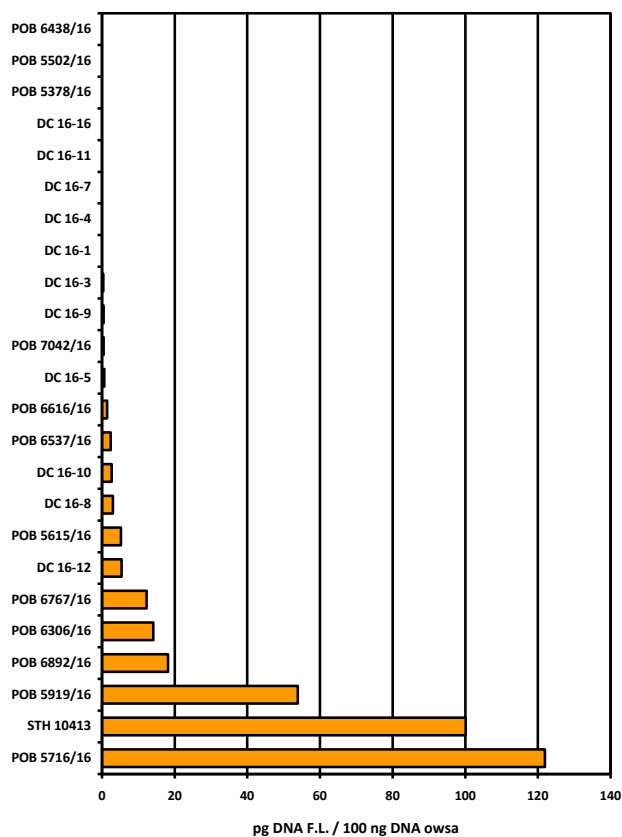


Rys. 17. Przebieg reakcji Real-Time PCR dla prób ziarna różnych rodów hodowlanych i odmian uprawnych owsa na obecność *F. langsethiae*



Rys. 18. Stężenie DNA *F. langsethiae* w ziarnie różnych gatunków owsa

Na podstawie analizy ilościowej *F. langsethiae* stwierdzono istotne zróżnicowanie dotyczące wrażliwości pomiędzy przebadanymi 24 rodami hodowlanymi (rys. 19). Obecność tego patogena stwierdzono w ziarnie 16 rodów hodowlanych owsa. Najwięcej DNA *F. langsethiae* odnotowano w ziarnie rodu hodowlanego owsa POB 5716/16 i STH 10413, znacznie mniej w ziarnie pozostałych rodów. DNA *F. langsethiae* nie stwierdzono w ziarnie następujących rodów hodowlanych owsa: DC 16-1, DC 16-4, DC 16-7, DC 16-11, DC 16-16, POB 5378/16, POB 5502/16, POB 6438/16 (rys. 19).

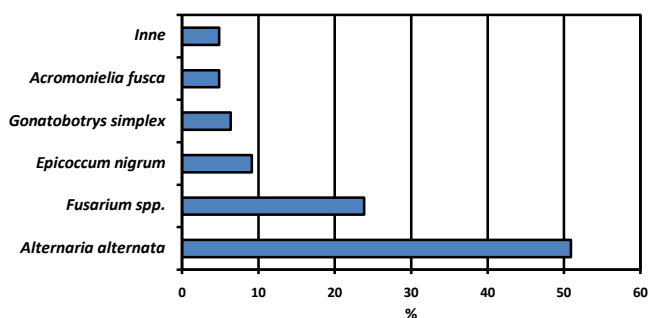


Rys. 19. Analiza odporności rodów owsa - stężenie DNA *F. langsethiae* w zebranym ziarnie

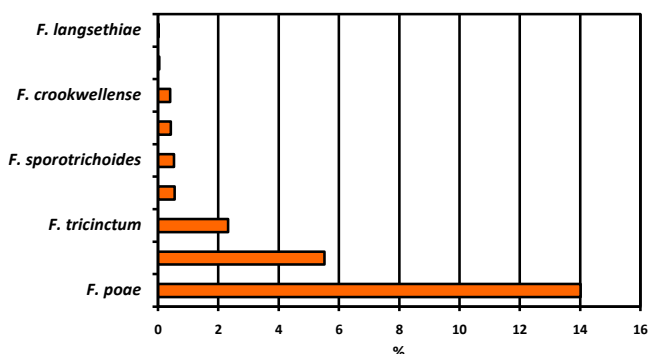
Badając występowanie *F. langsethiae* w ziarnie odmian uprawnych próby owsa pobierano z ZDOO Jelenia Góra, ZDOO Rychliki i ZDOO Żabnica. Obecność grzyba stwierdzono we wszystkich lokalizacjach. Średnio najczęściej było go w ziarnie z ZDOO Rychliki, jednak stwierdzono go tylko w ziarnie jednej odmiany – Bingo. W próbach z ZDOO Jelenia Góra i ZDOO Żabnica zainfekowane grzybem *F. langsethiae* były po cztery odmiany uprawne.

W wyniku przeprowadzonej izolacji grzybów na pożywce PDA, z ziarna owsa o różnym genotypie, spośród 40 prób ziarna, z 1 próby uzyskano izolat *F. langsethiae*.

Znacznie więcej uzyskano innych gatunków grzybów, które nie były głównym przedmiotem badań, jednak ich występowanie mogło znacząco wpływać na liczbę uzyskanych izolatów *F. langsethiae*. Z tego względu zostały one również uwzględnione w analizie. Ziarno owsa najczęściej było zasiedlone przez grzyby saprotroficzne, zwłaszcza *Alternaria alternata*, rzadziej *Epicoccum nigrum*, *Gonatobotrys simplex* i *Acromoniella fusca* (rys. 20). W próbach tych stwierdzono również różne gatunki grzybów rodzaju *Fusarium*, spośród których dominował *F. poae*. Znacznie rzadziej izolowano takie gatunki tego rodzaju jak: *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichoides*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. oxysporum* oraz *F. langsethiae* (rys. 21).



Rys. 20. Dominujące gatunki grzybów izolowane z ziarna różnych genotypów owsa



Rys. 21. Gatunki *Fusarium* izolowane z ziarna różnych genotypów owsa

Wnioski

- A. Czulość analizy Real-Time PCR na obecność *F. langsethiae* w ziarnie owsa okazała się przydatna w określaniu podatności owsa na porażenie przez tego patogena.
- B. Analizy Real-Time PCR potwierdziły istotne zróżnicowanie w zasiedleniu przez *F. langsethiae* ziarna rodów hodowlanych i odmian owsa. Największe stężenie DNA tego patogena odnotowano w ziarnie rodu POB 5716/16 i STH 10413.
- C. Znacznie większe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie owsa zwyczajnego o ziarnie oplewionym.
- D. Do tej pory nie stwierdzono istnienia genotypów owsa odpornych na porażenie przez *F. langsethiae*.